

# 放射線活性化型プロドラッグの創出に向けた分子設計に関する研究

(受託者) 国立大学法人京都大学

(研究代表者) 田邊一仁 大学院工学研究科

(研究開発期間) 平成22年度～23年度

## 1. 研究開発の背景とねらい

がんの治療では、より高い生存率が求められると共に、より高い機能温存と形態の保持が要求される。近年、理想的な治療を実現し得る新しいがん治療法として、抗がん剤と放射線療法を併用する化学放射線療法が注目されてきた。しかしながら、現時点では、使用する抗がん剤の副作用等の理由から、患者の容態によっては適用できないといった問題点が指摘されていた。

こうした問題の解決を目的として、本研究では化学放射線療法に適応可能で、かつ副作用の軽い放射線活性化型プロドラッグの開発を進めた。具体的には、抗がん活性を示す薬剤に置換基を導入することで薬剤を不活性化（プロドラッグ化）する一方で、X線照射により元の活性な構造に戻る機能性分子（プロドラッグ）を開発した。このプロドラッグは単に投与しただけでは何ら薬効を示さないが、X線を照射すると照射した部位でのみ活性化され、薬効を発現する。すなわち、患部にX線照射を行うと、放射線療法とともに化学療法が同時に始まる一方で、X線非照射部には、ほとんど影響を及ぼさない。従って、プロドラッグは副作用が低く、かつ疾患部（X線照射部）を選択的に攻撃する薬剤となる。

我々はこれまで、いくつかの抗がん剤のプロドラッグ化に取り組んできた。<sup>1</sup>この研究過程で水のX線照射によって生じる水和電子の還元反応を受け、結合開裂を生じる置換基（放射線分解型置換基：インドールキノン基・2-オキソアルキル基・ジスルフィド基・アジドメチル基など）を見出した。本研究では、これら置換基の機能を応用し、より活性が高く、効果的に薬効を発現する放射線活性化型プロドラッグシステムの構築を目指した。

## 2. 研究開発成果

低分子の化合物から成る抗がん剤の活性を制御すべく、抗がん剤そのものに放射線分解型置換基を導入したプロドラッグ候補化合物をデザインした。実際には、5-フルオロデオキシウリジン（5-FdUrd）、マイトマイシン、カンプトテシンの3種を修飾する抗がん剤として選択し、プロドラッグ化した。合成した化合物群のうち、放射線分解型置換基アジドメチル基をもつ5-FdUrd誘導体（N3-FdUrd）は比較的低線量のX線照射により5-FdUrdを遊離した。また、ヒト肺がん細胞A549を用いて、プロドラッグ機能を評価したところ、N3-FdUrdは単独ではほとんど毒性を示さない一方で、X線を6 Gy照射すると、有意な毒性を示した。これらの結果から、N3-FdUrdはX線照射下で活性な抗がん剤を遊離する放射線活性化型プロドラッグ抗がん剤として機能することが示された（図1）。<sup>2</sup>

次に、細胞内で発現する遺伝子の機能を放射線照射で制御する分子システムとして、放射線分解型置換基ジスルフィドをもつDNAzyme（SS-DNA 4）を開発した。ここで用いたDNAzymeとは、生体内酵素と同様の触媒作用をもつDNAオリゴマーであり、RNAを加水分解する制限酵素様の生理活性をもつ機能分子である。すなわち、DNAzymeの機能をX線で制御できれば、X線を照射した患部

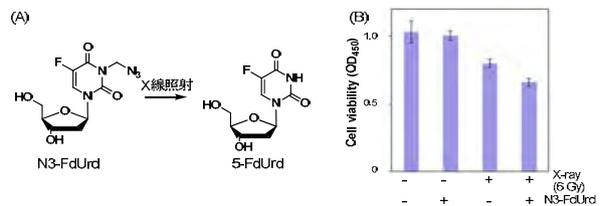


図1 プロドラッグN3-FdUrdの開発 (A)X線によるN3-FdUrdの構造変換 (B) N3-FdUrdの細胞実験 実験条件: A549 cells were cultured in the presence or absence of 100 nM N3-FdUrd, and treated with X-ray (6 Gy) under hypoxic conditions.

でのみ、RNA を分解できることから、きわめて副作用が低く選択性の高い毒性発現を成し得る核酸医薬品が構築できると考えた。本研究では DNAzyme の RNA 切断活性をジスルフィド結合含有阻害鎖で抑制する一方、X 線照射により阻害鎖が構造変換され、DNAzyme 活性が回復する分子システムを構築した (図 2)。

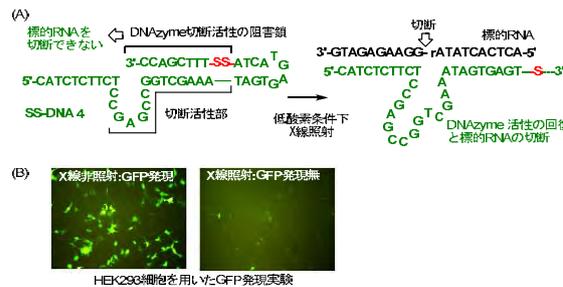


図2 核酸医薬品のX線による活性制御 (A)DNAzyme機能の抑制システム (B)X線照射(0 or 9 Gy)によるHEK293細胞内のGFP発現抑制

GFP をコードするプラスミド (P1) と機能を制御された DNAzyme (SS-DNA 4) を HEK293 細胞にトランスフェクトし、GFP 発現を蛍光顕微鏡で観察した。X 線を照射しない場合は A549 細胞内から明るい GFP の蛍光が観測された。このことは SS-DNA 4 上の阻害鎖が効果的に機能し、DNAzyme 活性を抑制したことを示している。他方、X 線を 9 Gy 照射すると GFP の発現はほとんど抑制された。これらの結果は、HEK293 細胞に取り込まれた SS-DNA 4 が X 線照射下で DNAzyme 活性を回復し、GFP 発現を抑制したことを強く示唆している。すなわち、DNAzyme 活性を細胞内で X 線照射により制御できた。

次に効果的なドラッグターゲティングを実現すべく、X 線照射下で崩壊するドラッグキャリアをデザインした。具体的には、キャリアを形成する両親媒性化合物に放射線分解型置換基ジスルフィド結合を導入することで、X 線照射とともに両親媒性分子から成る会合体が分解し、内包された薬剤がリリースされるシステムを作成した。親水部として DNA オリゴマー、疎水部としてオクタデカンをジスルフィド結合で連結した両親媒性分子 (Alky1-SS-ODN) を合成し、機能を評価した。ヒト肺がん細胞 A549 に、薬剤カンプトテシンを内包させた Alky1-SS-ODN 1 会合体を投与した後、低酸素条件下で X 線を照射した。その結果、3 Gy の X 線を照射すると生存率は 60% にまで下がることがわかった。X 線を照射しない場合、ほとんどの細胞は生存したことから、Alky1-SS-ODN から成る会合体は放射線照射下でのみ崩壊し、薬剤を放出するキャリアとして駆動することがわかった。<sup>3</sup>

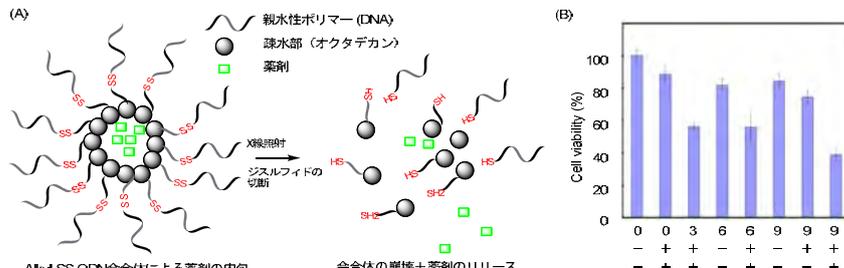


図3 (A)X線照射によって崩壊するナノキャリア分子 (B)抗がん剤カンプトテシン(CPT)を内包するAlky1-SS-ODN 会合体へのX線照射によって誘発される細胞毒性実験条件: A549 cells were X-irradiated in the presence of the aggregate of Alky1-SS-ODN 1 (200 μM) containing CPT (200 nM) under hypoxic conditions and then incubated for 48 h.

### 3. 今後の展望

本研究では、放射線照射下で駆動するプロドラッグの開発を試みた。合成した候補化合物のうち、抗がん剤のプロドラッグ N3-FdUrd、核酸医薬品 DNAzyme のプロドラッグ SS-DNA 4、X 線活性化型ドラッグキャリア Alky1-SS-ODN 会合体の 3 種は生きた細胞を用いた実験で良好な機能を示した。いずれの化合物も比較的低線量の X 線照射で活性化され、それぞれ薬効を示した。実用化に向け、今後動物を用いた実験を進める予定である。

### 4. 参考文献

(1) Tanabe, K. et al. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3745-3757. (2) Tanabe, K. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1682. (3) Tanabe, K. et al. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1909.